8 月 August
2020, 63(8): 961 - 972
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: // www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2020. 08. 006

细胞色素 P450 基因 *AsCYP6Z2* 在中华按蚊溴氰菊酯抗性维持中的作用

韩宝珠, 车林苇, 陈晓洁, 闫振天, 乔　梁*, 陈　斌*

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】探究细胞色素 P450 基因 *AsCYP6Z2* 是否与中华按蚊 *Anopheles sinensis* 抗拟除虫菊酯有关。【方法】克隆中华按蚊 *AsCYP6Z2* 基因的编码区。采用实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)检测该基因在中华按蚊溴氰菊酯敏感品系(WX-LS)和抗性品系(YN-LR)雌蚊不同发育阶段的表达和在敏感品系雌蛹不同组织中的表达。雌蛹腹部后端分别在 25 mg/mL 溴氰菊酯溶液和纯丙酮溶液(对照)中体外培养后,采用 qPCR 检测 *AsCYP6Z2* 在溴氰菊酯处理组和丙酮对照组中的表达差异。于化蛹后 10 h 分别注射 ds*AsCYP6Z2*(RNAi 组)和 ds*EGFP*(对照组),采用 qPCR 检测 *AsCYP6Z2* 在 RNAi 组和对照组中的表达差异;采用生物测定方法测定 RNAi 组和对照组中雌成蚊接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 内的击倒率及雌成蚊接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 并恢复 24 h 时的死亡率。通过分子对接预测该基因与溴氰菊酯相互作用的氨基酸残基。【结果】克隆获得了 *AsCYP6Z2* 基因(GenBank 登录号: MT840336)的编码区,其开放阅读框(ORF)长 1 251 bp,编码 416 个氨基酸,无信号肽和跨膜结构域。发育表达谱表明,*AsCYP6Z2* 基因主要在化蛹 30 h 至成蚊 3 h 期间高表达,且抗性品系的基因表达量明显高于敏感品系的;组织表达谱显示该基因在腹部后端的表达量较高,其次是在腹部前端和胸部,在头部的表达量最低。雌蛹腹部后端在 25 mg/mL 溴氰菊酯溶液中培养 12 h 和 24 h 后,处理组中 *AsCYP6Z2* 的表达量相比于对照组(纯丙酮培养组)分别上调 4 倍和 13 倍。RNAi 干扰 *AsCYP6Z2* 后,RNAi 组中 *AsCYP6Z2* 基因的表达量相较于对照组(ds*EGFP* 注射组)下调了约 80%。雌成蚊接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 后,RNAi 组中的个体比对照组中的约提前 20 min 出现明显的击倒现象,且击倒率明显高于对照组;雌成蚊接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 并恢复 24 h 后,RNAi 组中的个体死亡率相比对照组增加了 17%, 表明沉默 *AsCYP6Z2* 基因导致蚊虫对溴氰菊酯的敏感度显著增加。溴氰菊酯与 AsCYP6Z2 预测蛋白的分子对接研究结果显示,溴氰菊酯可以进入 AsCYP6Z2 蛋白的结合口袋,并且与 Cys-155 形成 Pi-硫相互作用以及产生较稳定的氢键,侧链也可与 AsCYP6Z2 的 Ala-165, Val-72, Leu-76, Leu-82 和 Ala-24 等氨基酸残基形成稳定的疏水相互作用网络。【结论】研究结果表明 *AsCYP6Z2* 基因参与中华按蚊溴氰菊酯抗性表型的维持,这为进一步探究该基因在拟除虫菊酯类杀虫剂代谢过程中的分子机理奠定了前期基础。

关键词: 中华按蚊; 溴氰菊酯抗性; 细胞色素 P450; *AsCYP6Z2*; 诱导表达; RNAi; 分子对接

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)08-0961-12

Role of the cytochrome P450 gene *AsCYP6Z2* in the maintenance of deltamethrin resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672363, 31872262, 31772527); 国家科技基础性工作专项重点项目(2015FY210300); 重庆市自然科学及基金项目(CSTC2017JCYJAX0023); 重庆市巴渝学者"青年学者"人才计划(YS2019027); 重庆市教委科技项目(KJQN201900523); 重庆师范大学青年拔尖人才培育计划

作者简介: 韩宝珠, 女, 1996 年 9 月生, 辽宁铁岭人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: 18883963926@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: qiaoliangswu@163.com; bin.chen@cqnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-01-16; 接受日期 Accepted: 2020-03-25

HAN Bao-Zhu, CHE Lin-Rong, CHEN Xiao-Jie, YAN Zhen-Tian, QIAO Liang*, CHEN Bin*
(Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: 【Aim】 To investigate whether the cytochrome P450 gene *AsCYP6Z2* is related to the pyrethroid resistance in *Anopheles sinensis*. 【Methods】 The coding region of the *AsCYP6Z2* gene of *An. sinensis* was cloned. The expression profiles of this gene in different developmental stages of female mosquitoes of the deltamethrin-susceptible strain (WX-LS) and resistant strain (YN-LR) of *An. sinensis* and its expression profiles in different segments of female pupae of WX-LS were detected by real-time quantitative PCR (qPCR). The posterior segment of female pupal abdomen was incubated with 25 mg/mL deltamethrin solution and acetone (control), respectively, and the consequent expression response of *CYP6Z2* between the deltamethrin treatment group and the acetone control group was compared by qPCR. After injection with ds*AsCYP6Z2* (the RNAi group) and ds*EGFP* (the control group) into the 10 h old pupa, the difference in the expression level of *AsCYP6Z2* between the RNAi group and the control group was compared by qPCR, the knockout rate of female adults after exposure to 0.05% deltamethrin film in 1 h and the mortality of female adults after exposure to 0.05% deltamethrin film for 1 h and then recovered for 24 h in the RNAi group and the control group were determined by bioassay method. Furthermore, the amino acid residues interacting with deltamethrin were predicted by using molecular docking. 【Results】 The coding region of *AsCYP6Z2* gene (GenBank accession no.: MT840336) was cloned, and its ORF is 1 251 bp in length, encoding 416 amino acids without signal peptide and transmembrane domain. Developmental expression profiles revealed that *AsCYP6Z2* gene was highly expressed in the period from 30 h old pupa to 3 h old adult, and its expression level in the resistant strain was significantly higher than that in the susceptible strain. Tissue expression profiles revealed that *AsCYP6Z2* was highly expressed in the posterior segments of abdomen, followed by in the anterior segments of abdomen, throax and head. At 12 h and 24 h after incubation of the posterior segments of female pupal abdomen with 25 mg/mL deltamethrin solution, the expression level of *AsCYP6Z2* increased by 4-fold and 13-fold as compared with the control (incubated with acetone), respectively. After RNAi of *AsCYP6Z2*, the expression level of *AsCYP6Z2* gene in the RNAi group decreased by about 80% compared with the control group (ds*EGFP* injection group). When the female adults were exposed to 0.05% deltamethrin film in 1 h, the individuals in the RNAi group showed significant knockdown phenomenon about 20 min in advance, and the knockdown rate was significantly higher than that in the control group. In addition, the mortality of individuals in the RNAi group after exposure to 0.05% deltamethrin film for 1 h and then recovered for 24 h increased by 17% compared to the control group, indicating that silencing the *AsCYP6Z2* gene results in a significant increase in mosquito sensitivity to deltamethrin. The molecular docking between deltamethrin and the predicted AsCYP6Z2 protein showed that deltamethrin can enter the binding pocket of AsCYP6Z2 protein, forming a Pi-sulfide interaction with Cys-155 and generating more stable hydrogen bonds. The side chain can also form a stable hydrophobic interaction network with Ala-165, Val-72, Leu-76, Leu-82, Ala-24 and other amino acid residues of AsCYP6Z2. 【Conclusion】 The results indicate that the *AsCYP6Z2* gene is involved in maintaining the deltamethrin resistance phenotype of *An. sinensis*, laying a foundation for further exploring the molecular mechanism of *AsCYP6Z2* gene in the metabolism of pyrethroid insecticides.

Key words: *Anopheles sinensis*; deltamethrin resistance; cytochrome P450; *AsCYP6Z2*; induced expression; RNAi; molecular docking

蚊虫分布广,传播多种烈性疾病(如疟疾、登革热、寨卡病毒等),严重威胁人们健康(Enserink, 2015)。在媒介蚊虫的防控方面,杀虫剂的使用尤为普遍。其中,拟除虫菊酯类杀虫剂因高效低毒被

广泛使用。然而，拟除虫菊酯类杀虫剂的滥用导致蚊虫的抗药性不断增强（王燕红等，2017）。蚊虫抗药性表现在行为方面和生理方面。行为上，蚊虫回避杀虫剂；生理上，主要包括靶标位点突变和解毒酶基因的过量表达代谢杀虫剂等（Brieke *et al.*, 2012）。代谢抗性主要涉及 3 大类解毒酶：细胞色素 P450 氧化酶（cytochrome P450, P450）、羧酸酯酶（carboxylesterase, COE）和谷胱甘肽-S-转移酶（glutathione S-transeferase, GST）（Weill *et al.*, 2003; Hemingway *et al.*, 2004）。其中，细胞色素 P450 是蚊虫体内对拟除虫菊酯类杀虫剂进行代谢作用的最主要的解毒酶系（Brooke *et al.*, 2001）。

细胞色素 P450 是一类含有血红素结构的超基因家族的末端氧化酶，主要分布在内质网和线粒体内膜上，还原态的该蛋白酶与 CO 结合，利用紫外分光光谱检测，其在 450 nm 处具有最大吸收峰值。昆虫细胞色素 P450 通常包含 5 个保守基序：螺旋 C（WxxxR）、螺旋 I（GxE/DTT/S）、螺旋 K（ExLR）、PERF 区（PxxFxPE/DRE）和血红素结合区（PFxxGxRxCxG/A）（Crooks *et al.*, 2004）。细胞色素 P450 广泛存在于生物体中，能够催化至少 60 多种化学反应，参与多种内源性化合物（类固醇激素、血脂等）的合成代谢和外源性化合物（药物、农药、天然产物等）的代谢解毒（Fuchs *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 2001; Feyereisen, 2012）。其中，CYP6 家族被认为能够代谢外源化合物和植物毒素（Feyereisen, 1999）。已有研究表明 CYP6 家族与杀虫剂的抗性有关，研究发现赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* QTC279 品系脑中特异高表达的 *TcCYP6BQ9* 基因是其对溴氰菊酯高度抗性的分子基础（Zhu *et al.*, 2010）；*AmCYP6AA2* 在耐溴氰菊酯的矮小疟蚊 *Anopheles minimus* 中的表达与对溴氰菊酯的抗性的发展密切相关（Rongnoparut *et al.*, 2003）；*AgCYP6P3* 和 *AgCYP6M2* 被证实与冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 耐拟除虫菊酯类杀虫剂的抗药性紧密关联（Matowo *et al.*, 2014）。

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 是我国及东南亚地区重要的传疟媒介（Chang *et al.*, 2014）。在本实验室的前期研究中，通过基因组鉴定和比较转录组差异分析，筛选出 16 个可能与溴氰菊酯抗性相关的 P450 基因，其中 9 个基因属于 CYP6 亚家族（Yan *et al.*, 2016）。在本研究之前，还没有关于中华按蚊 P450 基因参与拟除虫菊酯抗性的直接功能例证的报道。

本研究以中华按蚊为研究对象，结合前期的研究基础，从溴氰菊酯抗性品系（YN-LR）的表达谱中筛选出细胞色素 P450 基因 *AsCYP6Z2*，通过对该基因进行生物信息学分析、分子克隆、时空表达模式分析、诱导表达检测、RNAi 干扰及分子对接等研究手段，初步证实了 *AsCYP6Z2* 基因与中华按蚊对拟除虫菊酯类杀虫剂的耐受性相关，这对于进一步探讨其表达调控和在溴氰菊酯代谢机制方面的研究奠定了前期基础。

1　材料与方法

1.1　供试蚊虫

实验室敏感品系（WX-LS）为多世代自交系。抗性品系（YN-LR）是以采集自云南元阳的抗性个体作为供体亲本，并与实验室敏感品系进行多世代（不少于 10 代）回交而构建的近等位基因系。抗性品系的筛选检测方法是将羽化 3 d 的雌蚊移入 WHO 接触桶（含 0.05% 溴氰菊酯）中，60 min 后将接触桶蚊虫移到恢复筒中，统计死亡率（World Health Organization, 2016）。抗感品系均于室内同样条件（27℃、相对湿度 75%、光周期 12L: 12D）下饲养，每天给幼虫和蛹换两次清水和鱼苗食物，用 10% 葡萄糖溶液饲养成虫。

1.2　主要试剂与耗材

DNA 片段扩增所使用的TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase 购自北京全式金公司；DNA 片段纯化使用的E. Z. N. A.® Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司；大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞购自 TaKaRa 公司；RNA 提取使用的高纯度总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱型）购自北京百泰克生物技术有限公司；反转录试剂 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）购自 TaKaRa 公司；荧光定量 PCR 所使用的试剂 iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 及相关耗材购自 BIO-RAD 公司。

1.3　中华按蚊 *AsCYP6Z2* 基因克隆及生物信息学分析

AsCYP6Z2 基因的预测序列来源于本实验室闫正文等的前期分析（Yan *et al.*, 2016）。将该基因的预测序列作为问询序列，比对中华按蚊转录组数据库，获得其转录组序列，以此作为模板序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物（表 1），以溴氰菊酯抗性品系羽化 0 h 的成蚊和敏感品系雌蛹的

腹部分别作为 cDNA 的模板，克隆其开放阅读框序列。基因克隆实验中的 PCR 反应体系(25 μL)：5 × Buffer 5 μL，dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL，上下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL，Fastpfu 酶(2.5 U/μL) 0.5 μL，ddH$_2$O 15.5 μL。PCR 反应条件：95℃ 预变性 2 min；95℃ 20 s，58℃ 20 s，72℃ 35 s，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 5 min。引物合成及基因测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

利用在线软件 ExPASy 中 ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) 对 AsCYP6Z2 蛋白进行分子量、吸光值、等电点等理化性质的预测；AsCYP6Z2 蛋白的信号肽预测使用在线软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)；AsCYP6Z2 蛋白的跨膜区域预测使用 TMHMM 在线软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)；使用 NCBI 和 Vectorbase 提供的 BLASTP 在蛋白序列数据库中搜索同源序列，物种和基因登录号如下：赤拟谷盗 *T. castaneum* (XP_015834511.1)，家蚕 *Bombyx mori* (NP_001073135.1)，黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (NP_651082.1)，埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (AAEL009123)，致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (CPIJ019587)，冈比亚按蚊 *An. gambiae* (AGAP008218)，小菜蛾 *Plutella xylostella* (XP_011569123.1)。MEGA-X 构建进化树(Tamura *et al.*, 2013)，ClustalW 比对序列，预测氨基酸序列的最佳进化模型为 LG + G，基于最大似然法(maximum likelihood, ML)计算 *AsCYP6Z2* 基因的系统发育关系，重复计算 1 000 次。同时，采用在线比对工具 CLUSTALW (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw)及 GENEDOC 软件完成多序列比对分析。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物 Primer	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
clongingAsCYP6Z2-F	ATGTTCGTTTACATCCGAGATCC	基因克隆 Gene cloning
clongingAsCYP6Z2-R	CTAGTTTCGACGCTCCACCTTCAGT	
dsAsCYP6Z2-1-F(T7)	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGACAAAACTACAGCAGGAGAT	合成双链 RNA dsRNA synthesis
dsAsCYP6Z2-1-R(T7)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGTTCCAAACGGGTAGT	
dsEGFP-F(T7)	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGC	
dsEGFP-R(T7)	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCTCGTTGGGGTCTTTGCT	
qAsCYP6Z2-F	TCCGTAGCATTTGGCAGTCC	qPCR
qAsCYP6Z2-R	GTTCGTTTACACGCTCGGTCTT	
qAsRPL49-F	GGAGCCGGTCGGTGATATGT	
qAsRPL49-R	TTCCTTCTCGGTCGGCTTCG	

1.4 *AsCYP6Z2* 基因的时空表达谱分析

从溴氰菊酯敏感品系(WX-LS)和抗性品系(YN-LR)中华按蚊雌性个体的蛹期和成蚊期的不同发育阶段进行取样，共计 12 个时间点(蛹期 0, 10, 20 和 30 h，蛹末期，成蚊期 0, 3, 6, 9, 24, 48 和 72 h)，每组 3 个生物学重复。同样地，对溴氰菊酯敏感品系雌蛹的各区段进行取样，包括头部、胸部、腹部前 3 节(腹部前端)和腹部剩余部分(腹部后端)。取样使用 TRizol 试剂(Invitrogen，美国) 400 ~ 500 μL 置于 1.5 mL 离心管中，保存于 -80℃。液氮研磨，Trizol 法提取总 RNA，利用 TaKaRa RR047A 反转录试剂盒制备 cDNA，以此 cDNA 为模板用于 qPCR 检测。使用 Primer Premier 5.0 设计 *AsCYP6Z2* 的定量引物，以核糖体蛋白基因 *L49* (*RPL49*) 用作内参基因(Yan *et al.*, 2016)。qPCR 反应体系及操作参考本实验室乔梁等先前建立的方法(Qiao *et al.*, 2016)。引物序列如表 1 所示。

1.5 溴氰菊酯对 *AsCYP6Z2* 基因的诱导表达分析

选取化蛹 3 h，健康活泼的溴氰菊酯敏感品系(WX-LS)雌蛹个体，将蛹置于装有灭菌超纯水(含 5 μg/mL 氨苄青霉素)的培养皿里清洗 3 次。清洗后用蘸有 70% 酒精的脱脂棉轻轻擦拭蛹体表，再将蛹放置于 1 × PBS 的培养皿清洗。于灭菌载玻片上对蛹进行迅速解剖，将蛹腹部后端置于 1 × PBS 中洗涤 5 次，之后用无菌滤纸吸走液体。将 3 ~ 6 个腹部后端材料放入 1.5 mL 离心管中，离心管中加入 Grace 培养基(GIBCO BRL)且加入 6 μg/mL 苯硫脲以防止酚氧化酶活性；同时加入青霉素-链霉素；青霉素的工作浓度为 100 U/mL，链霉素为 0.1 mg/mL)。处理组材料样本中加入 25 mg/mL 过滤灭菌

的溴氰菊酯溶液(25 mg/mL 溴氰菊酯溶液的配制：1 mL 纯丙酮溶液加入中 1 μL 的溴氰菊酯原药)，对照组中加入等量过滤灭菌的纯丙酮溶液(World Health Organization，1981)。用锡箔纸包裹离心管后放置在水平摇床上，以 25 r/min 的速率和倾斜 30°的角度进行孵育，并设置 4 个生物学重复。孵育温度为 24℃，在孵育时间分别为 12 h 和 24 h 时，通过 qPCR 检测处理组和对照组中 *AsCYP6Z2* 基因的表达情况，检测和分析方法同 1.4 节。引物序列如表 1 所示。

1.6　*AsCYP6Z2* 基因的 RNAi 实验

使用 P1700 T7 RiboMAX™ Express RNAi 试剂盒(美国 Promega)合成 ds*AsCYP6Z2* 和对照 ds*EGFP* 双链 RNA。合成的双链 RNA 溶解于无 RNase 的水，测定纯度和浓度，并电泳检测。合成 dsRNA 所需引物如表 1 所示。

在进行击倒率和死亡率表型量化前，提前选取先批次化蛹的雌蛹，注射 ds*AsCYP6Z2*(RNAi 组)和 ds*EGFP*(对照组)，每组不少于 20 头，注射剂量为 800 ng，RNAi 组和对照组各进行两次平行实验，如表 2 所示。选取 RNAi 组和对照组蛹羽化 1 h 大小齐一、健康活泼且飞行良好的个体，按照每个生物学重复混合 5 头雌蚊的标准进行取样，并设置 3 个生物学重复。利用 Trizol 法提取样本的总 RNA，并使用 TaKaRa RR047 反转录试剂盒合成 cDNA 样本。通过 qPCR 检测 RNAi 组和对照组中 *AsCYP6Z2* 基因的表达量，以评估 RNAi 对靶基因表达的抑制效果。qPCR 分析中，以中华按蚊核糖体蛋白 L49 基因(*AsRPL49*)为内参。qPCR 反应体系及操作参考本实验室乔梁等先前建立的方法(Qiao *et al.*, 2016)。所需引物见表 1。

在量化击倒率和死亡率时，依据 *AsCYP6Z2* 基因时期和部位的表达模式，我们在化蛹 10 h 期间向蛹的腹部后端注入 dsRNA(RNAi 组注射 ds*AsCYP6Z2*，对照组注射 ds*EGFP*)。RNAi 组两组共计注射 81 头雌蚊，对照组两组共计注射 73 头雌蚊。将注射后的 RNAi 组和对照组的蛹吸入含 5 μg/mL 氨苄青霉素的超纯水中，于实验室常规饲养条件下饲养，并统计羽化率。待 RNAi 组和对照组中成蚊羽化至 1 h，选取大小齐一、活泼健康且具有良好飞行能力的个体，按照 WHO 接触桶法进行溴氰菊酯生测实验。详细操作为：将 RNAi 组和对照组的雌蚊以 25 头/筒轻轻吹入放置有 0.05% 溴氰菊酯药膜的接触桶中，吹入后立即计时，并记录蚊虫在接触溴氰菊酯药膜 10，20，30，40，50 和 60 min 时的击倒情况，利用 SPSS 25.0 对 RNAi 组和对照组个体的进行半数击倒时间(KT_{50})分析。在 60 min 后将接触桶中的雌蚊转移至恢复桶内，待其恢复 24 h后统计死亡率。生测实验均进行 2 次生物学重复。

1.7　同源建模与分子对接

使用在线同源建模服务器 Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/) 对 AsCYP6Z2 进行同源建模。验证所建模型立体化学性质的合理性用 Proheck 程序(Laskowski *et al.*, 1993)；对所建蛋白模型中的氨基酸残基的相容性评估使用 Verify-3D 程序；三维构象的显示与分析用 PDBview。

利用 ChemBioDraw Ultra 12.0 绘制化合物溴氰菊酯的结构，然后用 ChemBio3D Ultra 12.0 转化为 3D 结构并使用程序内置的 MMFF94 立场对化合物的构象进行优化。对接所需的蛋白以及化合物溴氰菊酯使用 AutoDockTools 1.5.6 转化为 PDBQT 格式后，使用 AutoDock 4.2.6 进行对子对接研究(Morris *et al.*, 2009)。AsCYP6Z2 蛋白的对接活性位点的坐标设置为：center_x = 55.847，center_y = 77.138，center_z = 12.205；size_x = 8，size_y = 8，size_z = 8；参数 exhaustiveness 设置为 20，其余参数均使用默认值，对接后选取得分最高的构象，使用 PyMol 2.3.4 (http://www.pymol.org/) 进行作图与结果分析。

2　结果

2.1　*AsCYP6Z2* 基因的克隆和序列特征

AsCPY6Z2(GenBank 登录号：MT840336)基因的开放阅读框(ORF)长 1 251 bp，编码 416 个氨基酸(图 1)。该基因氨基酸编码序列在抗感品系间没有差异。其氨基酸组成中，亮氨酸(Leu)所占比例最高，为 10.6%。运用 SingalP5.0 对 AsCYP6Z2 的氨基酸序列进行信号肽分析，结果表明 AsCYP6Z2 无信号肽。同时对 AsCYP6Z2 的氨基酸序列运用 TMHMM 2.0 软件进行跨膜结构域分析，结果表明该蛋白无跨膜结构域。

系统发生结果显示(图 3)：*AsCYP6Z2* 基因与冈比亚按蚊 *AgCYP6Z2* 基因的亲缘关系最近。氨基酸联配分析结果表明(图 2)，AsCYP6Z2 蛋白含有 5 个保守基序，分别为：螺旋 C(WxxxR)，螺旋 I(GxE/DTT/S)，螺旋 K(ExLR)，PERF 区(PxxFxPE/DRE)和血红素结合区(PFxxGxRxCxG/A)。

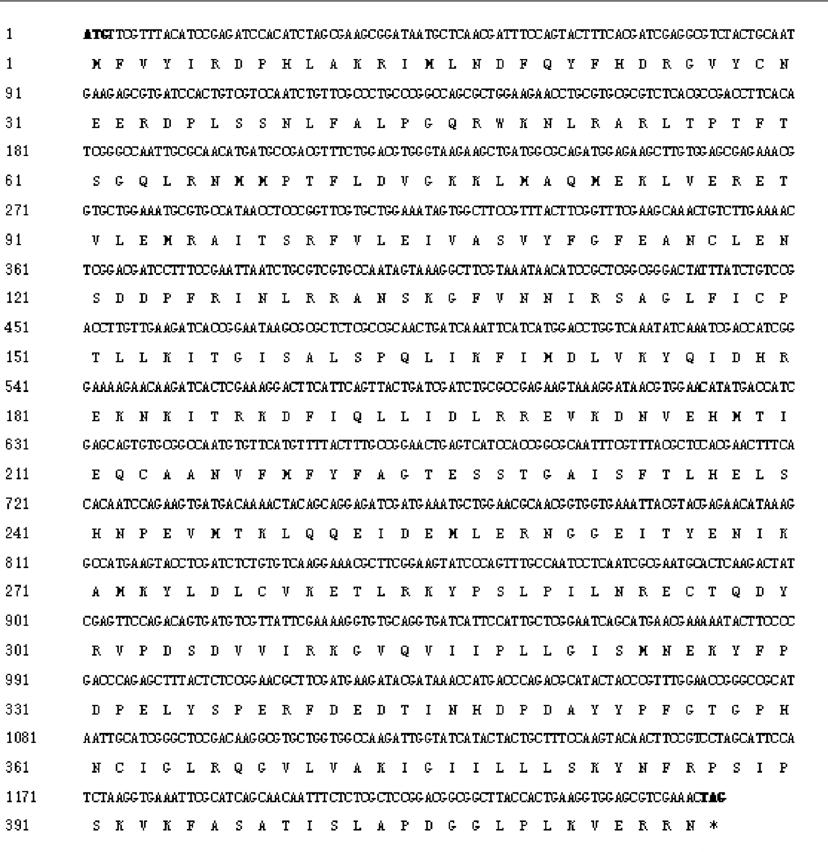


图 1 中华按蚊 *AsCYP6Z2* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *AsCYP6Z2* from *Anopheles sinensis*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 加粗，星号表示终止密码子。The start codon ATG and the stop codon TAG are in bold, and the stop codon is indicated with an asterisk.

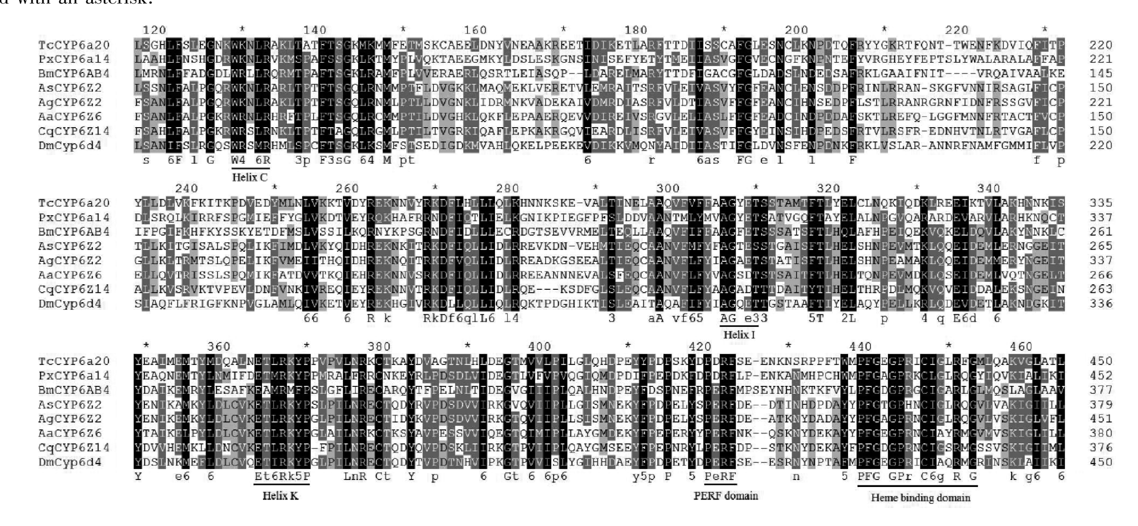


图 2 中华按蚊 AsCYP6Z2 与其他昆虫同源蛋白的序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of AsCYP6Z2 of *Anopheles sinensis* with homologous proteins from other insects

其他昆虫的蛋白质序列均下载自 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）。Protein sequences from other insects were downloaded from the NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). TcCYP6a20：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, XP_015834511.1；PxCYP6a14：小菜蛾 *Plutella xylostella*, XP_011569123.1；BmCYP6AB4：家蚕 *Bombyx mori*, NP_001073135.1；AsCYP6Z2：中华按蚊 *Anopheles sinensis*, MT840336；AgCYP6Z2：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, AGAP008218-PA；AaCYP6Z6：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, AAEL009123-PA；CqCYP6Z14：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, CPIJ019587-PA；DmCyp6d4：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_6510821.1. 多序列比对采用 CLUSTALW（https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw）和 GENEDOC。高度保守的残基用黑色阴影显示，图中标出了昆虫细胞色素 P450 的 5 个保守基序：Helix C（WxxxR），Helix I（GxE/DTT/S），Helix K（ExLR），PERF domain（PxxFxPE/DRE）和 Heme binding domain（PFxxGxRxCxG/A）。The multiple sequence alignment was performed using programs CLUSTALW (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) and GENEDOC. The highly conserved residues are shown in black shadows, and the five conserved motifs of insect cytochrome P450 including Helix C (WxxxR), Helix I (GxE/DTT/S), Helix K (ExLR), PERF domain (PxxFxPE/DRE), and Heme binding domain (PFxxGxRxCxG/A) are labeled in the figure.

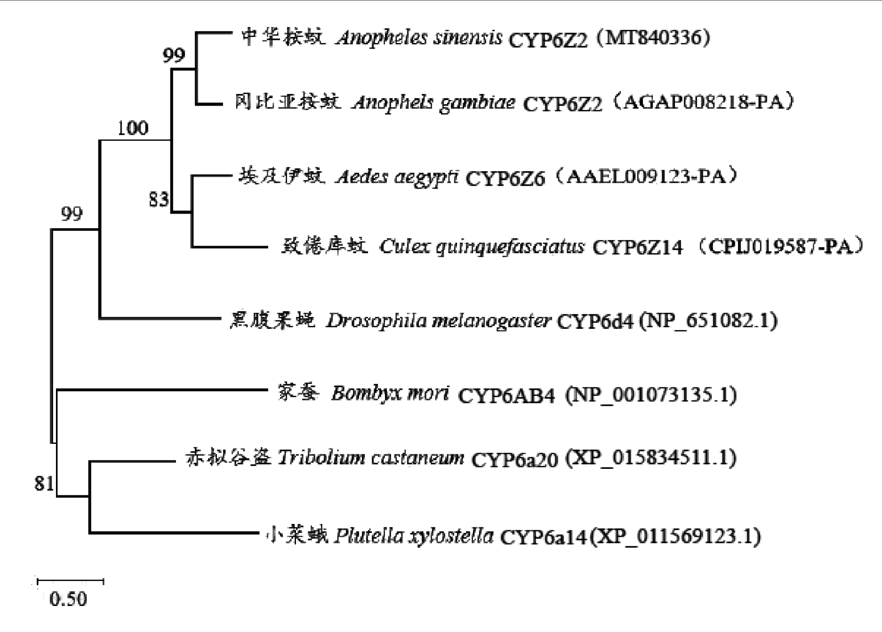


图 3　中华按蚊 *AsCYP6Z2* 与其他昆虫 CYP6 基因的系统发育进化关系

Fig. 3　Phylogenetic relationship of *AsCYP6Z2* gene of *Anopheles sinensis* and CYP6 gene from other insects

通过 MEGA-X 采用邻接法构建进化树，bootstrap 值为 1 000。以 0.50 的遗传距离作为标尺，各节点旁数值表示 *AsCYP6Z2* 基因在该标度枝进化过程中变化的程度。The phylogenetic tree was built with the neighbor-joining method using MEGA-X, with a bootstrap value of 1 000. The genetic distance of 0.50 is used as the scale bar, and the numbers next to each node indicate the extent to which the *AsCYP6Z2* gene changes during the evolution of the scale branch.

2.2　*AsCYP6Z2* 基因的时空表达模式

不同发育阶段的表达分析结果显示：在化蛹 0 h，*AsCYP6Z2* 基因的表达量非常低，且在抗感品系（YN-LR 和 WX-LS）间没有明显的表达差异。在敏感品系中，尽管 *AsCYP6Z2* 基因的表达量随着发育变化上调，但上调变化并不剧烈。而在抗性品系中，该基因在化蛹末期至成蚊羽化 3 h 间的表达量明显上调，其程度以蛹末期和刚羽化时最为显著。此外，在蛹末期、羽化 0，3 和 72 h，抗性品系中该基因的表达量显著高于敏感品系（$P<0.05$）。雌蛹不同部位的表达分析结果显示：*AsCYP6Z2* 基因在蛹腹部后端的表达量最高，其次是腹部前端和胸部，而头部中

A
相对表达量 Relative expression level
WX-LS
YN-LR
p0 p10 p20 p30 plast A0 A3 A6 A9 A24 A48 A72
发育阶段 Developmental stage

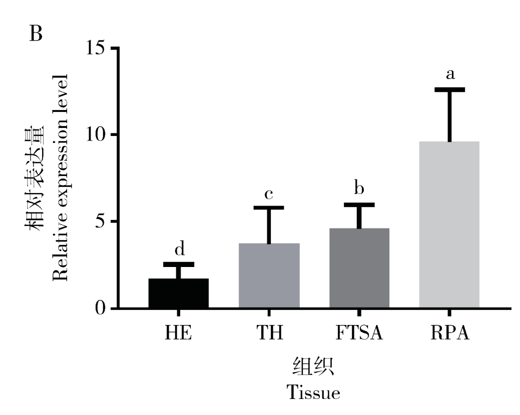


图 4　*AsCYP6Z2* 基因在中华按蚊溴氰菊酯抗感品系不同发育阶段（A）和溴氰菊酯敏感品系雌蛹不同组织（B）中的表达模式

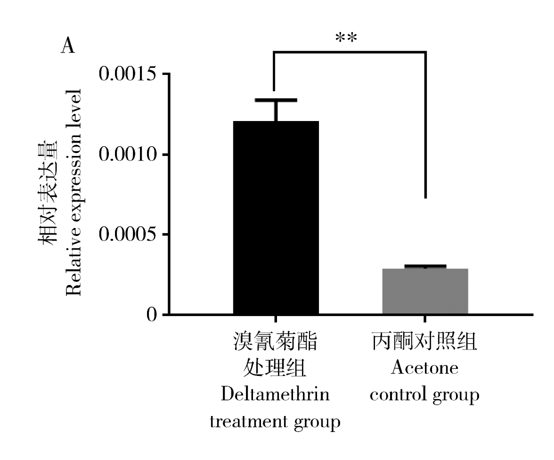
Fig. 4　Expression profiles of *AsCYP6Z2* gene in different developmental stages of the deltamethrin-resistant and susceptible strains of *Anopheles sinensis* (A) and tissues of female pupae of its deltamethrin-susceptible strain (B)

WX-LS：溴氰菊酯敏感品系 Deltamethrin-susceptible strain；YN-LR：溴氰菊酯抗性品系 Deltamethrin-resistant strain. P0 – 30：分别为化蛹后 0 – 30 h (0 – 30 h after pupation, respectively)；plast：蛹末期（化蛹后约 40 h）Late instar pupa (approximately 40 h after pupation)；A0 – 72：分别为羽化后 0 – 72 h 的成蚊 0 – 72 h after adult emergence, respectively. HE：头部 Head；TH：胸部 Throax；FTSA：腹部前 3 节 First three segments of abdomen；RPA：腹部剩余 Remaining parts of abdomen. 每组数据为 3 次生物学重复的平均值 ± 标准差。A 图星号表示抗感品系间基因表达量有显著性差异（$P<0.05$，*t* 检验）；B 图柱上不同字母表示不同组织间表达量差异显著（$P<0.05$，LSD 法）。Each data point represents mean ± *SD* of three biological replicates. The asterisk indicates significant difference in the expression level between the resistant strain and the susceptible strain ($P<0.05$, *t*-test) in Fig. A. Different letters above bars represent significant differences in the relative expression level among different tissues ($P<0.05$, LSD test) in Fig. B.

的表达量最低。依据发育阶段和组织表达模式结果,将化蛹 10 h 作为 RNAi 注射的时间点,注射部位为雌蛹腹部后端。

2.3 溴氰菊酯对 AsCYP6Z2 基因的诱导表达

中华按蚊雌蛹腹部后端在 25 mg/mL 溴氰菊酯溶液中培养后的结果显示: 12 h 后,处理组中 *AsCYP6Z2* 的表达量较对照组(纯丙酮溶液培养)上调了 4 倍($P < 0.01$);而在 24 h 后,处理组中 *AsCYP6Z2* 的表达量较对照组则上调了 13 倍($P < 0.001$)。这些结果表明溴氰菊酯能够诱导 *AsCYP6Z2* 基因的显著上调表达。



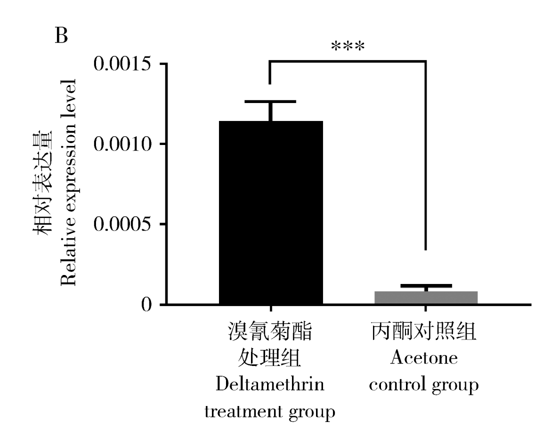


图 5 中华按蚊雌蛹腹部后端经溴氰菊酯处理 12 h(A)和 24 h(B)后 *AsCYP6Z2* 基因的表达量变化

Fig. 5 Changes in expression level of *AsCYP6Z2* after exposure of posterior segment of female pupal abdomen of *Anopheles sinensis* to deltamethrin for 12 h (A) and 24 h (B)

图中数据为平均值 ± 标准差;星号表示溴氰菊酯处理组(25 mg/mL 溴氰菊酯培养)和丙酮对照组(丙酮培养)有显著性差异(** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)(*t* 检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. Asterisk indicates significant difference between the deltamethrin treatment group (incubated with 25 mg/mL deltamethrin solution) and the acetone control group (incubated with acetone) (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) (*t*-test).

2.4 RNAi 干扰 *AsCYP6Z2* 后中华按蚊对溴氰菊酯敏感性的变化

在 RNAi 实验中,蚊虫羽化率均在 90% 以上(表 2)。通过 RNAi 沉默 *AsCYP6Z2* 基因后,结合 qPCR 检测该基因的表达量。结果表明,与对照组相比,RNAi 组中 *AsCYP6Z2* 表达量下调了约 80% ($P < 0.0001$)(图 6: A),说明通过 RNAi 有效地抑制了 *AsCYP6Z2* 基因的表达。

RNAi 后雌成蚊接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 内的击倒曲线显示:RNAi 组从生测 10 min 开始即出现击倒现象;而对照组则是从 30 min 时才开始出现击倒现象。两者间呈现出明显的击倒差异(Log-rank $P < 0.01$)(图 6: B)。根据蚊虫在生测期间的击倒个数(表 3),所计算的半数击倒时间(KT_{50})显示:RNAi 组中溴氰菊酯对雌成蚊的 $KT_{50} = 31.789 \pm 3.459$ min,对照组中溴氰菊酯对雌成蚊的 $KT_{50} = 41.107 \pm 3.716$ min。此外,接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 并经 24 h 恢复后,RNAi 组中蚊虫的死亡率比照组增加了 17% ($P < 0.05$)(图 6: C)。RNAi 结果说明,沉默 *AsCYP6Z2* 基因后中华按蚊对溴氰菊酯的敏感性显著增加,表明 *AsCYP6Z2* 基因在蚊虫对溴氰菊酯的抗性上有重要作用。

表 2 RNAi 实验数据统计

Table 2 Statistics of RNAi experiment data

分组 Group	dsRNA	注射个体数 Numbers of injected individuals	存活个体数 Numbers of survival individuals	生测中测试个体数 Number of test individuals in bioassay	羽化率(%) Emergence rate
第 1 组	ds*AsCYP6Z2*	44	40	37	90.9
Group 1	ds*EGFP*	40	37	37	92.5
第 2 组	ds*AsCYP6Z2*	37	34	34	91.9
Group 2	ds*EGFP*	33	31	31	93.9

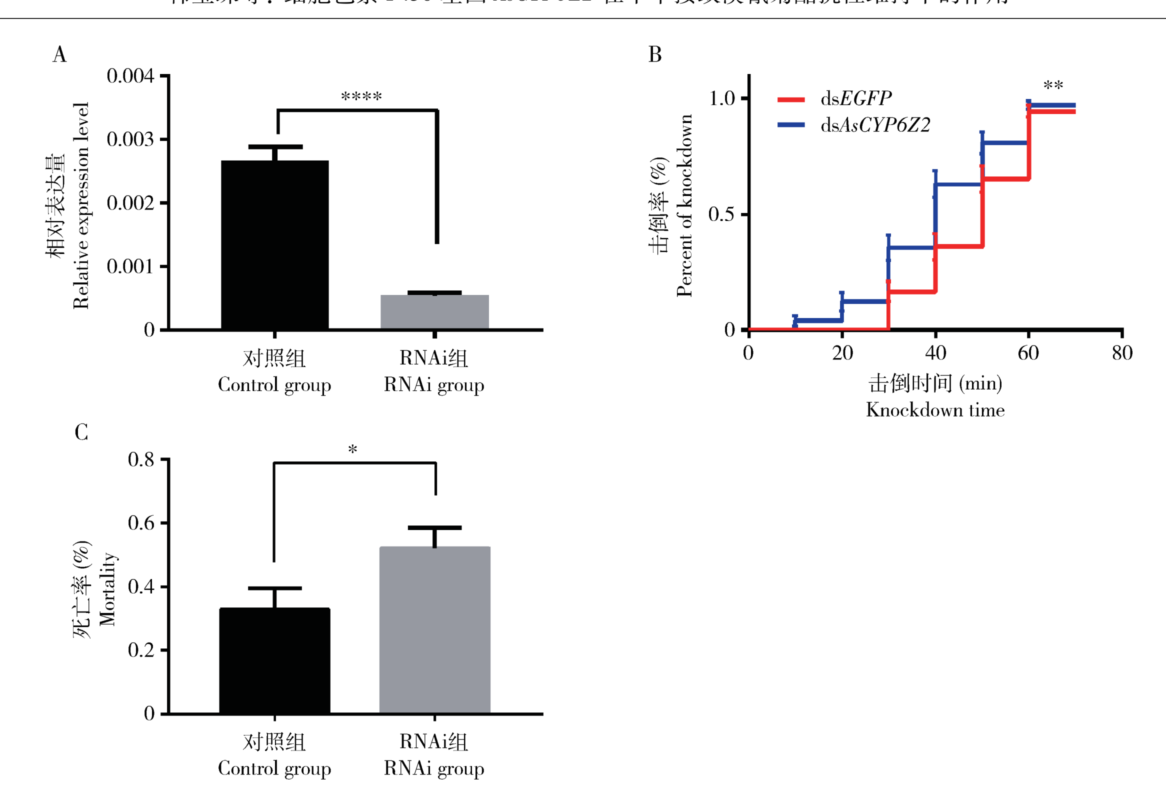


图 6　RNAi 干扰 *AsCYP6Z2* 后中华按蚊雌成蚊对溴氰菊酯敏感性的变化

Fig. 6　Changes in susceptibility of female adults of *Anopheles sinensis* to deltamethrin after RNAi-based silencing of *AsCYP6Z2* gene

A：RNAi 后 RNAi 组（注射 ds*AsCYP6Z2*）和对照组（注射 ds*EGFP*）中 *AsCYP6Z2* 基因的表达水平 Expression level of *AsCYP6Z2* gene in the RNAi group (injection with ds*AsCYP6Z2*) and the control group (injection with ds*EGFP*) after RNAi；B：干扰 *AsCYP6Z2* 基因后蚊虫接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 期间击倒情况 Knockdown of mosquitoes after exposure to 0.05% deltamethrin film for 1 h after interference with *AsCYP6Z2* gene；C：干扰 *AsCYP6Z2* 基因后蚊虫接触 0.05% 溴氰菊酯药膜 1 h 恢复 24 h 后的死亡率 Mortality of mosquitoes exposed to 0.05% deltamethrin film for 1 h and recovered for 24 h after interference with *AsCYP6Z2* gene. RNAi 组和对照组中个体的注射剂量均为 800 ng,用于检测基因表达的每个生物学重复中混合 5 头雌蚊,并设置 3 个生物学重复。图中数据为平均值 ± 标准差；星号表示 RNAi 组和对照组之间有显著性差异（* $P<0.05$；** $P<0.01$；**** $P<0.00001$）（*t* 检验）。The injection doses of individuals in the RNAi group and the control group were both 800 ng. Five female adults were mixed in each biological replicate for detecting gene expression level, and 3 biological replicates were set up. The data in the figure are mean ± *SD*. The asterisk indicates significant difference between the RNAi group and the control group (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; **** $P<0.00001$) (*t*-test).

表 3　RNAi 干扰 *AsCYP6Z2* 后生测期间中华按蚊雌成蚊击倒个数

Table 3　Number of female adults of *Anopheles sinensis* knocked down during the biometric test after RNAi-based silencing of *AsCYP6Z2*

分组 Group	dsRNA	生测期间蚊虫击倒个数 Number of mosquitoes knocked down during the bioassay					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
第 1 组 Group 1	ds*AsCYP6Z2*	2	3	8	8	8	8
	ds*EGFP*	0	0	5	9	11	12
第 2 组 Group 2	ds*AsCYP6Z2*	1	3	9	12	5	4
	ds*EGFP*	0	0	7	5	10	9

2.5　AsCYP6Z2 与溴氰菊酯的分子对接分析

以 AsCYP6Z2 的氨基酸序列为模板，RCSB Protein Data Bank 网站中在线搜索，比对出智人 *Homo sapiens* CYP3A5（PDB：6MJM）蛋白序列与 AsCYP6Z2 的同源性最高，序列一致性为 39%。选取 CYP3A5 的三维结构作为同源建模的模板，对 AsCYP6Z2 进行同源建模，得到 AsCYP6Z2 的二聚体三维结构模型图（图 7：A）。将溴氰菊酯对接至 AsCYP6Z2，溴氰菊酯以互补的方式结合在 AsCYP6Z2 的结合口袋，分子对接预测结果显示：溴氰菊酯的母核苯环以及侧链的酯羰基分别与 Cys-155 形成 Pi-硫相互作用以及稳定的氢键，侧链的二溴乙烯基片段与二甲基环丙基片段则可以与口袋两侧的 Ala-165，Val-72，Leu-76，Leu-82 和 Ala-24 形

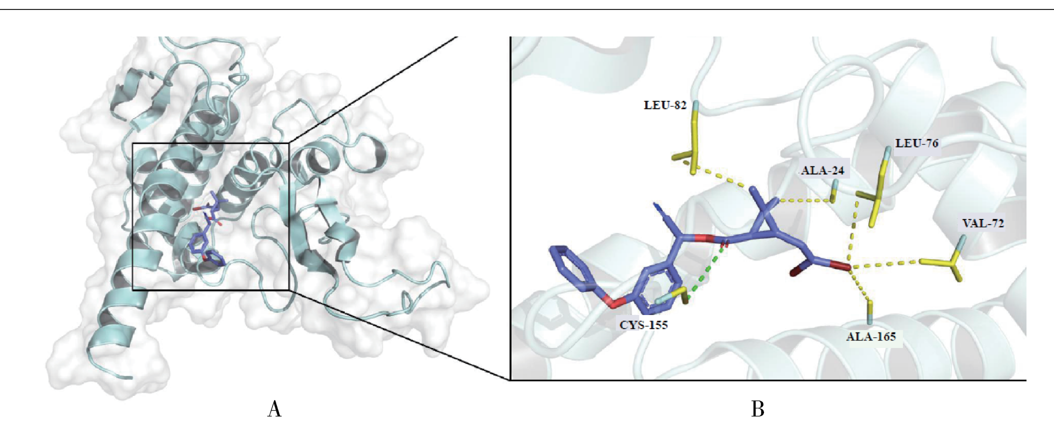


图 7　AsCYP6Z2 蛋白与溴氰菊酯的分子对接模型

Fig. 7　Molecular docking model of AsCYP6Z2 protein and deltamethrin

A: 溴氰菊酯对接至 AsCYP6Z2 的结合口袋 Deltamethrin docking to AsCYP6Z2 binding pocket; B: 溴氰菊酯对接至 AsCYP6Z2 的结合位点 Deltamethrin docking to the binding site of AsCYP6Z2.

成稳定的疏水相互作用网络(图 7: B)。根据对接结果推测,溴氰菊酯与 AsCYP6Z2 在疏水作用和氢键等的相互作用下可能形成稳定复合物。

3　讨论

有研究报道表明,转录水平的上调表达可能是细胞色素 P450 酶系活性增强的重要因素之一(Liu and Scott, 1998; Li *et al.*, 2006)。例如,在家蝇 *Musca domestica* 的抗性品系中,*CYP6D1*, *CYP6A24* 和 *CYP6D3v2* 基因存在过量表达现象,家蝇拟除虫菊酯的抗性可能与上述 P450 基因的过表达有关(Kamiya *et al.*, 2001)。在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中,*CYP6M2* 和 *CYP6P3* 能够代谢氯菊酯和溴氰菊酯,并且在野外抗性种群中上调表达(Djouaka *et al.*, 2008); *CYP6P9*, *CYP6P4*, *CYP6Z1*, *CYP6Z3* 和 *CYP6M7* 被报道在催命按蚊 *Anopheles funestus* 中与拟除虫菊酯杀虫剂的抗性密切相关(David *et al.*, 2013; Riveron *et al.*, 2013)。在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 与阿拉伯按蚊 *Anopheles arabiensis* 中,*CYP6Z1*, *CYP6Z2* 和 *CYP6M2* 等显著上调表达后,可能增强上述基因编码产物在氯菊酯代谢过程中的作用(Chiu *et al.*, 2011; Munhenga and Koekemoer, 2011)。研究表明,上调基因中的 CYP6, CYP9 和 CYP4 亚家族成员,与蚊虫对杀虫剂的抗性有关,其中 CYP6 家族被认为与抗药性关系最为密切的家族(Feyereisen *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2016)。*AsCYP6Z2* 基因属于 CYP6 家族,其表达量在抗性品系中明显上调。我们推测,*AsCYP6Z2* 基因的上调表达可能是 YN-LR 品系中维持溴氰菊酯抗性的因素之一。在昆虫中,中肠、脂肪体和马氏管等器官中 P450 的活性通常较高,并且被认为是主要的解毒代谢器官(Brun *et al.*, 1996)。飞蝗细胞色素 P450 基因 *LmCYP6FD3* 在马氏管、中肠中高表达,显示出该基因在外源物质解毒过程中发挥重要作用(朱文雅等, 2017)。*AsCYP6Z2* 基因在腹部的表达量明显高于在其他部位,而腹部是重要的代谢组织如中肠、马氏管所在的场所。因此,腹部可能是 AsCYP6Z2 蛋白行使生物学功能的主要部位。在后续的研究中,在全面调查 *AsCYP6Z2* 基因全发育和全组织表达模式的基础上,将研究该基因在不同品系与不同组织间表达调控差异的分子基础。

已有大量证据表明,多种昆虫中的 P450 基因家族成员在杀虫剂抗性方面有重要功能。例如,沉默小菜蛾 *CYP321E1* 基因后,幼虫对氯虫酰胺杀虫剂的抵抗能力明显减弱,而引起其死亡率明显增加(Hu *et al.*, 2014); 沉默抗性品系小菜蛾 *P. xylostella* 幼虫体内过量表达的 *CYP6BG1* 基因后,导致幼虫对苄氯菊酯杀虫剂的抗性显著降低(Bautista *et al.*, 2008); 淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* *CYP6AA9* 基因随着溴氰菊酯抗性水平的提高,其表达水平也不断提高,利用 RNAi 技术沉默抗性品系(Lab-DR2) *CYP6AA9* 基因,导致淡色库蚊的死亡率显著增加(Lv *et al.*, 2016)。本研究中,*AsCYP6Z2* 基因被沉默后,蚊虫对溴氰菊酯的敏感度显著增加,死亡率明显升高,这初步证实了 *AsCYP6Z2* 基因在溴氰菊酯抗性表型维持中的功能。这也为今后建立该基因的突变敲除系,并更全面系统评估其功能表型提供了参考。

现有的研究发现,溴氰菊酯可被细胞色素 P450

羟基化。例如，在油菜花露尾甲 *Meligethes aeneus* 中，*CYP6BQ23* 在抗拟除虫菊酯类杀虫剂的幼虫和成虫中过量表达，且重组表达的 CYP6BQ23 表现出对溴氰菊酯的羟基化催化活性（Zimmer *et al.*, 2014）。在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中，重组表达的 CYP6Z8 能够代谢拟除虫菊酯，产生 3-苯氧基苯甲醇和 3-苯氧基苯甲醛（Chandor-Proust *et al.*, 2013）。在我们的研究中，分子对接预测结果暗示 AsCYP6Z2 与溴氰菊酯间可能存在互作，推测其可能参与催化溴氰菊酯代谢。在此基础上，今后将会探究 AsCYP6Z2 的酶学性质与杀虫剂代谢机理。

参考文献（References）

Bautista Ma, Miyata T, Miura K, Tanaka T, 2008. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, *CYP6BG1*, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(1): 38–46.

Brieke C, Rohrbach F, Gottschalk A, Mayer G, Heckel A, 2012. Light-controlled tools. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(34): 8446–8476.

Brooke BD, Kloke G, Hunt RH, Koekemoer LL, Temu EA, Taylor ME, Small G, Hemingway J, Coetzee M, 2001. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, 91(4): 265–272.

Brun A, Cuany A, Le Mouel T, Bere J, Amichot M, 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, *CYP6A2*, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(7): 697–703.

Chandor-Proust A, Bibby J, Régent-Kloeckner M, Roux J, Guittard-Crilat E, Poupardin R, Riza MA, Pain M, Dauphin-Villemant C, Reynaud S, David JP, 2013. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem. J.*, 455(1): 75–85.

Chang XL, Zhong DB, Fang Q, Hartsel J, Zhou GF, Shi L, Fang FJ, Zhu CL, Yan GY, 2014. Multiple resistances and complex mechanisms of *Anopheles sinensis* mosquito: a major obstacle to mosquito-borne diseases control and elimination in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8(5): e2889.

Chiu TL, Wen ZM, Rupasinghe SG, Schuler MA, 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae CYP6Z1*, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(26): 8855–8860.

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE, 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.*, 14(6): 1188–1190.

David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJI, 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 368(1612): 20120429.

Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C, 2008. Expression of the cytochrome P450s, *CYP6P3* and *CYP6M2* are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae s. s.* from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*, 9: 538.

Enserink M, 2015. An obscure mosquito-borne disease goes global. *Science*, 350(6264): 1012–1013.

Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 507–533.

Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(6): 1252–1255.

Feyereisen R, 2012. Insect CYP genes and P450 enzymes. In: Gilbert LI ed. Insect Molecular Biology and Biochemistry. Elsevier, London. 236–316.

Fuchs SY, Spiegelman VS, Belitsky GA, 1994. Inducibility of various cytochrome-P450 isozymes by phenobarbital and some other xenobiotics in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Pharmacol.*, 47(10): 1867–1873.

Harrison TL, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR, 2001. Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a host plant allelochemical. *Arch. Insect Biochem.*, 48(4): 179–189.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 653–665.

Hu Z, Lin Q, Chen H, 2014. Identification of a novel cytochrome P450 gene, *CYP321E1* from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance. *Bull. Entomol. Res.*, 104(6): 716–723.

Kamiya E, Yamakawa M, Shono TS, 2001. Molecular cloning, nucleotide sequences and gene expression of new cytochrome P450s (CYP6A24, CYP6D3v2) from the pyrethroid resistant housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 36(2): 225–229.

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM, 1993. PROCHECK – A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst*, 26(2): 283–291.

Li A, Yang Y, Wu S, Li C, Wu Y, 2006. Investigation on the resistance mechanisms to fipronil in diamondback moth. *J. Econ. Entomol.*, 99(3): 914–919.

Liu N, Scott JG, 1998. Increased transcription of *CYP6D1* causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in housefly. *Insect Mol. Biol.*, 28(8): 531–535.

Lv Y, Wang WJ, Hong SC, Lei ZT, Fang FJ, Guo Q, Hu SL, Tian MM, Liu BG, Zhang DH, Sun Y, Ma L, Shen B, Zhou D, Zhu CL, 2016. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* by RNA-seq. *Mol. Genet. Genomics*, 291(1): 309–321.

Matowo J, Jones CM, Kabula B, Ranson H, Steen K, Mosha F, Rowland M, Weetman D, 2014. Genetic basis of pyrethroid resistance in a population of *Anopheles arabiensis*, the primary

malaria vector in Lower Moshi, north-eastern Tanzania. *Parasit. Vectors*, 7(1): 274.

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ, 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30(16): 2785–2791.

Munhenga G, Koekemoer LL, 2011. Differential expression of cytochrome P450 genes in a laboratory selected *Anopheles arabiensis* colony. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(59): 12711–12716.

Qiao L, Du M, Liang X, Hao Y, He X, Si F, Mei T, Chen B, 2016. Tyrosine hydroxylase is crucial for maintaining pupal tanning and immunity in *Anopheles sinensis*. *Sci. Rep.*, 6: 29835.

Riveron JM, Irving H, Ndula M, Barnes KG, Ibrahim SS, Paine MJ, Wondji CS, 2013. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(1): 252–257.

Rongnoparut P, Boonsuepsakul S, Chareonviriyaphap T, Thanomsing N, 2003. Cloning of cytochrome P450, CYP6P5, and CYP6AA2 from *Anopheles minimus* resistant to deltamethrin. *J. Vector Ecol.*, 28(2): 150–158.

Tamura K, Stech G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.

Wang YH, Zheng AH, Liu QY, Kang L, Zou Z, 2017. Advances in research on vector insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 54(3): 364–371. [王燕红, 郑爱华, 刘起勇, 康乐, 邹振, 2017. 虫媒疾病传播媒介的研究进展. 应用昆虫学报, 54(3): 364–371]

Weill M, Duron O, Labbé P, Pasteur N, 2003. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: towards an understanding of the evolution of ace genes. *Med. Sci.*, 19(12): 1190–1192.

World Health Organization, 1981. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1–6.

World Health Organization, 2016. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Yan ZW, Li JY, Yan ZT, 2016. Genome-wide and expression-profiling analyses reveal the main cytochrome P450 genes related to pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera Culicidae). *Pest Manag. Sci.*, 74(8): 1810–1820.

Zhu F, Parthasarathy R, Bai H, Woithe K, Kaussmann M, Nauen R, Harrison DA, Palli SR, 2010. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 8557–8562.

Zhu WY, Wu HH, Zhang XY, Liu J, Zhang JZ, Ma EB, 2017. Expression profiles of the cytochrome P450 gene *LmCYP6FD3* in *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) and its role in insecticide detoxification. *Acta Entomol. Sin.*, 60(7): 742–749. [朱文雅, 吴海花, 张学尧, 刘娇, 张建珍, 马恩波, 2017. 飞蝗细胞色素 P450 基因 *LmCYP6FD3* 的表达及其在杀虫剂解毒中的作用. 昆虫学报, 60(7): 742–749]

Zimmer CT, Bass C, Williamson MS, Kaussmann M, Wölfel K, Gutbrod O, Nauen R, 2014. Molecular and functional characterization of CYP6BQ23, a cytochrome P450 conferring resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 45: 18–29.

(责任编辑: 赵利辉)